



Docket No. 017P23US

DHL EXPRESS 552 3246 886

In the application of: Peter Offermann et al.
Serial Number: 10/799,329
Filing Date: 3/12/2004
Title: Support Material for Tissue Engineering, for Producing
Implants or Implant Materials, and an Implant Produced with
the Support Material

**Commissioner for Patents
Alexandria, VA 22313-1450**

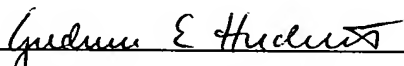
REQUEST TO GRANT PRIORITY DATE

Pursuant to 35 USC 119 and 37 CFR 1.55, applicant herewith claims priority of
the following **German** patent application(s):

103 12 144.7 filed 3/13/2003.

A certified copy of the priority document is enclosed.

Respectfully submitted July 22, 2004,



Ms. Gudrun E. Hockett, Ph.D.
Patent Agent, Reg. No. 35,747
Lönsstr. 53
42289 Wuppertal
GERMANY
Telephone: +49-202-257-0371
Telefax: +49-202-257-0372
gudrun.draudt@t-online.de

GEH/Enclosure: German priority document(s) 10312144.7

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 12 144.7

Anmeldetag: 13. März 2003

Anmelder/Inhaber: Technische Universität Dresden, 01062 Dresden/DE

Bezeichnung: Trägermaterial für die Gewebe- und Zellkultur und die Herstellung von Implantatmaterialien

IPC: C 12 N 11/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. März 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Ebert

Trägermaterial für die Gewebe- und Zellkultur und die Herstellung von Implantatmaterialien

Die Erfindung betrifft ein Trägermaterial für die Zell- und Gewebekultur (Tissue Engineering) zur Herstellung von Implantatmaterialien, wie insbesondere von Knochen- Knorpel- oder Hautersatz oder von extrakorporalen Organersatz oder als Implantat selbst oder zur anderweitigen Verwendung in der Medizin oder Biotechnologie.

Es ist bereits bekannt, Zellen auf Trägermaterialien (Scaffolds) zu kultivieren und die so hergestellte Gewebekultur als Gewebeersatz zu verwenden.

Als Trägermaterialien werden z. B. Gele, Faserstoffe, poröse Keramiken oder andere dreidimensionale Strukturen eingesetzt.

Es ist bekannt, verschiedene Gewebe, wie z. B. Knorpel, die durch Verletzung, Abnutzung oder Krankheit defekt sind, mit Hilfe von gezüchteten Gewebekulturen zu therapieren. Hierzu werden körpereigene Zellen beispielsweise in dreidimensionale Trägermaterialien eingebracht und *in vitro* vermehrt und das so hergestellte Material in den Körper implantiert.

Die für biokompatible Implantate eingesetzten Trägermaterialien haben wesentlichen Einfluss auf die Besiedelung, das Zellwachstum und die spätere Funktion des Implantates.

Faserstoffe bieten große Oberflächen für den Kontakt mit Zellen und bilden offenporige Strukturen, die für die Versorgung der Zellen mit Nährlösung notwendig sind. Häufig kommen heute Vliesstoffe zum Einsatz, die jedoch nachteilige Inhomogenitäten in der Struktur aufweisen. So werden größere Freiräume zwischen den Fasern nur sehr langsam von Zellen durchwachsen. In Bereichen, in denen die Fasern sehr dicht liegen ist die Zelldichte dagegen sehr gering. Eine Organisation der Faseranordnung in Vliesstoffen ist durch die starke Streuung in der Faserorientierung nur begrenzt möglich. Textile Flächengebilde aus Fäden sind zwar sehr gut strukturiert (s. o.), aber die Abstände zwischen den Fasern sind extrem unterschiedlich. Innerhalb der Fäden, die üblicherweise aus je 20 bis 200 Fasern bestehen, liegen die Fasern extrem dicht und zwischen den Fäden bestehen oft sehr große Abstände.

Trägermaterialien aus textilen Flächengebilden, insbesondere aus Vliesstoffen, Fasergeweben oder Maschenstoffen, weisen durch die überwiegend horizontale Anordnung der Fasern nur eine sehr geringe Druckstabilität auf.

Aus DE 19959088 A1 ist beispielsweise ein Melt-Blown-Verfahren zur Herstellung von dreidimensionalen luftverwirbelten Vliesen bekannt. Die Vliesstrukturen haben Porengrößen zwischen 20 µm und 500 µm und eine Porosität von < 95 %.

In DE 197 216 61 A1 werden in einem dreidimensionalen Gitter angeordnete Stäbe zur Herstellung von Knochen- und Knorpelersatzstrukturen für den unmittelbaren Einsatz *in vivo* beschrieben. Diese Stäbe bestehen aus biopolymeren, thermoplastischen Werkstoffen und werden mittels selektivem Lasersinterns aus einer pulverförmigen Schicht oder in einem *Three-Dimensional Printing (3-DP)* Verfahren, ähnlich dem Funktionsprinzip eines Tintenstrahldruckers, schichtweise zu einem dreidimensionalen Gitter aufgebaut.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein weiteres Trägermaterial für die Gewebe- und Zellkultur und die Herstellung von Implantatmaterialien anzugeben.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch ein biokompatibles Trägermaterial für die Gewebe- und Zellkultur und die Herstellung von Implantatmaterialien, bestehend aus einem Basismaterial, das auf mindestens einer Seite mit Fasern elektrostatisch beflockt ist.

Durch die elektrostatische Beflockung sind die Fasern nahezu senkrecht auf der Oberfläche des Basismaterials angeordnet. Vorteilhaft verhindert die durch die elektrostatische Beflockung erreichte hohe Faserauszugsfestigkeit ein Loslösen der Fasern von dem Basismaterial.

Vorteilhaft ergibt das erfindungsgemäße Trägermaterial ein druckstabiles und elastisches Wachstumsgitter für die Zellbesiedlung *in vitro* bzw. das Einwachsen von Zellen *in vivo*. Die hohe Druckstabilität wird erreicht durch die nahezu senkrechte Ausrichtung der Fasern und eine hohe Beflockungsdichte. Die erreichbare

Beflockungsdichte ist umso höher, je kürzer die zur Beflockung eingesetzten Fasern sind. Je dichter die Beflockung und je kürzer die Fasern sind, umso weniger können die Fasern unter Druck zur Seite knicken, da sie von den benachbarten Fasern daran gehindert werden.

Das erfindungsgemäße biokompatible Trägermaterial wird nach einem Verfahren der elektrostatischen Beflockung hergestellt, wie beispielsweise in DE 196 35 214 für die Herstellung eines Folien-Dämmstoffes für die Wärmeisolation und Schallschutz beschrieben. Dabei werden biokompatible Fasern annähernd senkrecht auf ein biokompatibles Basismaterial aufgebracht. Die elektrostatische Beflockung wird vorzugsweise mit Gleichstrom durchgeführt. Vorzugweise wird für die elektrostatische Beflockung das Basismaterial auf der zu beflockten Seite mit einem Klebstoff beschichtet.

In einer vorzugsweisen Ausführungsform der Erfindung bestehen Basismaterial, Klebstoff und/oder Fasern aus einem resorbierbaren Material. Unter resorbierbarem Material ist hier und im folgenden Text zu verstehen, dass das Material nach der Implantation im Körper langsam abgebaut wird bzw. sich langsam auflöst. Eine partielle Resorption des Materials kann auch während der Zellkultivierung *in vitro* einsetzen.

Als resorbierbares Material wird für das Basismaterial vorzugsweise eine Membran oder ein Tape aus Kollagen, oder Kollagenderivaten, einschließlich mineralisiertem Kollagen, oder anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix, gewählt. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Basismaterial aus einem Faserstoff, Vlies oder Gewebe aus resorbierbaren Polyesterfasern aufgebaut.

In einer alternativen Ausführungsform ist das Basismaterial aus einem nicht-resorbierbaren biokompatiblen Material, wie z. B. einem biokompatiblen Metall (Titan, einer Titanlegierung, Stahl etc.), Kunststoff (PMMA, Polystyrol, Polycarbonat etc.), Keramik (Calciumphosphat, Aluminiumoxid etc.) Glas oder Kohlenstoff (Kohlefaserverbundwerkstoff etc.) aufgebaut.

Vorzugsweise hat das Basismaterial eine flache, wellige oder gewölbte Form, insbesondere in Form einer Membran (Tape). In einer alternativen Ausführungsform ist das Trägermaterial ein dreidimensionaler Formkörper oder Hohlkörper. Vorzugsweise hat das Basismaterial eine profilierte Oberfläche. Als flache Materialien kommen beispielsweise mineralisierte oder nicht-mineralisierte Kollagen- bzw. Kollagen-Hyaluronsäure-Tapes, dünne Vliesstoffe (z. B. Nadelvliesstoffe aus Poly-L-lactid), Folien oder auch Fasergewebe zum Einsatz.

Das Basismaterial ist vorzugsweise so strukturiert, dass es Kräfte aufnimmt und das Trägermaterial bei Belastung zusammenhält.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden in das Basismaterial durch Schneiden, vorzugsweise mittels Stanzgerät, Wasserstrahl oder Laser, Löcher mit definierter Größe und Form eingeführt. Vorzugsweise werden die Löcher in das Basismaterial nach der Beflockung eingeführt. Das Ausschneiden nach der Beflockung hat den Vorteil, dass die Flockfasern am Lochrand nahezu senkrecht angeordnet sind.

Vorzugsweise wird als resorbierbarer Klebstoff Gelatine, ein Kollagen-Gel oder Hyaluronsäure verwendet. Als Klebstoff kommen aber auch andere biokompatible Materialien in Betracht. Vorzugsweise wird der Klebstoff nach der Beflockung quervernetzt. Die Quervernetzung wird durch chemische Crosslinker, wie z. B. EDC N[']-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid Hydrochlorid), oder andere bekannte Methoden, wie z. B. durch UV- oder Gamma-Strahlung erreicht. Die Quervernetzung erfolgt insbesondere bei der Verwendung von Gelatine, einem Kollagengel oder Hyaluronsäure als Klebstoff, um ein schnelles Auflösen dieser Klebstoffe in wässriger Umgebung sowie ein Weichwerden während der Zellkultur bei 37°C zu vermeiden. Gleichzeitig wird durch den Crosslinker auch die Bindung zwischen Fasern, Klebstoff und Basismaterial verstärkt.

Die Fasermaterialien sind vorzugsweise resorbierbare Polyester, wie z. B. Polylactid (PLA), Caprolacton, Polyhydroxybuttersäure (PHB) und Polyglycolsäure, oder deren Derivate und Copolymere.

Als Fasermaterialien werden in einer weiteren vorzugsweisen Ausführungsform auch nicht resorbierbare Faserstoffe eingesetzt, wie z. B. Polyacrylate, Polyamide, Polypropylen, Polytetrafluorethylen, Cellulose, Viskose oder andere Cellulosederivate, Kohlenstoff, nicht bzw. langsam resorbierbare Polyester oder Kombinationen dieser Materialien, verwendet. Neben organischen Polymeren kommen auch anorganische Materialien wie Glas, Keramik, SiO_2 , Kohlenstoff oder Metalle, oder Mischungen zum Einsatz. Die Materialien haben vorzugsweise hydrophile Oberflächen, um eine gute Benetzung mit dem Klebstoff zu erreichen.

Die Fasermaterialien müssen die für die elektrostatische Beflockung bekannten Eigenschaften aufweisen, wie z. B. einen ausreichenden elektrischen Oberflächenwiderstand von $10^6 - 10^8 \Omega$, der gegebenenfalls durch geeignete Präparationen bei der Fadenherstellung oder nachträglich erreicht wird. Der elektrische Widerstand der Flockfasern beeinflusst vor allem deren Ladungs- und Flugverhalten sowie die Gleichmäßigkeit der beflockten Flächen. Weiterhin hat das geometrische Verhältnis von Faserdurchmesser und Faserlänge einen wesentlichen Einfluss auf die Verarbeitungseigenschaften im Flockprozess. Es können Flockfasern mit einer Faserlänge zwischen 0,3 mm und 8 mm verarbeitet werden. Vorzugsweise weisen die einzelnen Fasern eine Länge zwischen 0,3 mm und 3 mm auf, insbesondere zwischen 0,5 mm und 1,5 mm. Der Durchmesser der einzelnen Fasern beträgt vorzugsweise zwischen 10 μm und 200 μm . Je kürzer die eingesetzten Fasern, desto höher ist die Druckstabilität des Trägermaterials.

In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung werden Fasern unterschiedlichen Materials, Durchmessers und/oder unterschiedlicher Länge kombiniert. Lange Flockfasern werden dabei durch kurze Fasern gestützt. Durch die Kombination unterschiedlich langer Fasern wird auch die erreichbare Faserdichte erhöht und eine unebene, strukturierte Oberfläche erreicht.

In einer weiteren vorzugsweisen Ausführungsform der Erfindung werden zur Reduzierung der Fasermasse und zur Steigerung der Druckelastizität Hohlfasern eingesetzt, welche offen- oder geschlossenporig sind.

Vorzugsweise haben die Fasern auf dem Basismaterial einen mittleren Abstand von 40 µm bis 130 µm. Es hat sich herausgestellt, dass die so gebildeten Zwischenräume zwischen den Fasern optimal für die Besiedlung des Trägermaterials mit Zellen sind.

In einer vorzugsweisen Ausführungsform der Erfindung ist das Basismaterial in einem frei definierbaren Muster beflockt. Durch definierte Bereiche mit und ohne Flockfasern wird die Zellbesiedlung gesteuert. Die Zellen siedeln sich bevorzugt auf den beflockten Bereichen, zwischen den Fasern, an. Das Basismaterial ist einseitig beflockt oder auf mehreren Seiten. Eine partielle Beflockung bzw. eine Beflockung in frei definierbaren Mustern wird durch ein partielles Aufbringen des Klebstoffes oder durch auf den Klebstoff aufgebrachte Schablonen vor der Beflockung erreicht.



In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das biokompatible Trägermaterial mindestens teilweise mineralisiert. Ein solches mineralisiertes Trägermaterial eignet sich insbesondere für den Einsatz als Knochenersatzmaterial. Bei einer teilweisen Mineralisierung sind vorzugsweise nur einzelne Komponenten, besonders vorzugsweise das Basismaterial mineralisiert. Bevorzugt wird das Trägermaterial oder Bestandteile desselben mit Hydroxylapatit, der Calciumphosphat-Phase des Knochens, mineralisiert. Die Herstellung eines teilweise mineralisierten Trägermaterials wird vorzugsweise dadurch erreicht, dass beim Aufbau des Trägermaterials mineralisierte Materialien, z. B. ein mineralisiertes Kollagen-Tape, als Basismaterial eingesetzt wird.



In einer weiteren Ausführungsform wird das fertig gebildete biokompatible Trägermaterial mineralisiert. Zu dieser Mineralisierung werden ein zur Mineralisierung von Kollagen bzw. Kollagentapes bekanntes Verfahren, wie z. B. die Abscheidung von Hydroxylapatit aus simulierter Körperflüssigkeit (SBF), (S.-H. Rhee, J. Tanaka: Hydroxyapatite coating on a collagen membrane by a biomimetic method. *J. Am. Ceram. Soc.* 1998, 81, 3029-3031) analog angewandt.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung sind an das Basismaterial, den Klebstoff oder die Fasern Wirkstoffe gebunden. Unter Wirkstoffen sind hier z. B. pharmazeutische Stoffe, Peptide, Proteine, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Cytokine,

Chemokine, Oligonukleotide, Nukleinsäuren, wie cDNA, oder Nukleinsäurenderivate zu verstehen. Die Bindung dieser Stoffe an das jeweilige Material wird vorzugsweise durch kovalente Bindung an das Material oder Vermischen mit dem Material bei der Herstellung, oder, z. B. durch Vermischen mit dem Klebstoff, vor der Beflockung erreicht. Die Bindung dieser Stoffe an das Trägermaterial kann aber auch nach der Beflockung erfolgen. Neben der kovalenten Anbindung können die Wirkstoffe auch adhäsiv oder mit anderen Methoden an das Trägermaterial oder dessen Komponenten, wie z. B. die Fasern, gebunden sein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein mehrlagiges Trägermaterial (Mehrschicht-Scaffold), in dem mindestens zwei der oben beschriebenen biokompatiblen Trägermaterialien miteinander verbunden sind.

Durch den mehrlagigen Schichtaufbau werden durch die elektrostatische Beflockung definiert zellspezifische Porenabstände und definierte Lagenabstände erzeugt. Die Flockfasern wirken somit im mehrlagigen Aufbau als Abstandshalter.

In einer bevorzugten Ausführungsform des mehrlagigen Trägermaterials sind die einzelnen Trägermaterialien übereinandergestapelt. Dabei ergibt sich der Abstand zwischen den Basismaterialien der in Schichten angeordneten Trägermaterialien aus der Faserlänge zwischen den Basismaterialien. Vorzugsweise besteht die Verbindung zwischen den Trägermaterialien aus einer zusätzlichen Klebstoffschicht. Für den Klebstoff werden die oben genannten Materialien verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform des mehrlagigen Trägermaterials werden die einzelnen Trägermaterialien mit ihren Faserschichten ineinander gesteckt. Durch das Ineinanderstecken der Faserschichten bilden diese eine gemeinsame Faserschicht in der sich die Faserdichten addieren. Das Ineinanderstecken der Faserschichten hält vorteilhaft die beiden Trägermaterialien ohne eine zusätzliche Klebstoffschicht zusammen.

In einer besonders vorzugsweisen Ausführungsform enthält das mehrlagige biokompatible Trägermaterial Hohlräume, die untereinander verbunden oder voneinander isoliert sind. Vorzugsweise wird durch diese ein Hohlraumsystem mit gestreckt, kanalförmig und/oder mäanderförmig verlaufenden, miteinander verbunden Hohlräumen gebildet.

Diese Hohlräume werden z. B. beim Zusammensetzen zu einem mehrlagigen Trägermaterial durch definierte Bereiche ohne Flockfasern auf den Basismaterialien und vorzugsweise durch den Einsatz definiert perforierter Basismaterialien gebildet. Diese durchgängigen und vorzugsweise dreidimensional miteinander verbundenen Hohlräume dienen unter anderem der Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr zu den Zellen.

Vorteilhaft kann das erfindungsgemäße biokompatible Trägermaterial als Implantatmaterial, zur Herstellung von Zell- und Gewebeimplantaten, sowie in der Zell- oder Gewebekultur und auch zur Herstellung eines extrakorporalen Organersatzes verwendet werden.

Bei der Verwendung als Implantatmaterial wird in einer vorzugsweisen Ausführungsform das Trägermaterial, ohne vorherige Zellbesiedlung in den Körper implantiert. Nach der Implantation wird das Trägermaterial, in diesem Falle *in vivo* mit durch Zellen, die aus dem umgebenden natürlichen Gewebe stammen, besiedelt. Diese Zellen wachsen dabei in die Flockfaserzwischenräume ein. Ist das Trägermaterial komplett aus resorbierbaren Materialien aufgebaut, wird es vorteilhaft innerhalb weniger Wochen bis weniger Jahre, bevorzugt innerhalb weniger Monate nach der Implantation resorbiert und durch körpereigenes Gewebe ersetzt.

In einer weiteren vorzugsweisen Ausführungsform der Erfindung wird das Trägermaterial *in vitro* mit Zellen besiedelt. Dazu wird das Trägermaterial für wenige Tage bis wenige Wochen mit Zellen kultiviert. Während dieser Zeit besiedeln Zellen das Trägermaterial bzw. wachsen in das Material ein. Dieses mit Zellen besiedelte Trägermaterial wird entweder als Gewebeersatz im Sinne des Tissue Engineering in den Körper implantiert oder es verbleibt für andere Aufgaben, wie des extrakorporalen Organersatzes (z. B. eines temporären Leber-Ersatzes) außerhalb des Körpers.

In einer weiteren Variante der Erfindung wird das Basismaterial und/oder der Klebstoff des Trägermaterials nach der Besiedlung mit Zellen entfernt, wenn die Zellen das Trägermaterial durch Sezernierung neugebildeter extrazellulärer Matrix soweit stabilisiert haben. Die Entfernung des Basismaterials bzw. Klebstoffes erfolgt mechanisch, chemisch, und/oder enzymatisch. Bestehen Basismaterial und/oder Klebstoff aus Kollagen, wird die Entfernung vorzugsweise mit Kollagenase unterstützt.

Anhand nachfolgender Zeichnungen und Ausführungsbeispiele wird die Erfindung näher erläutert. Dabei zeigen

- Fig. 1. Schnittdarstellung eines Trägermaterials
- Fig. 2. Dreidimensionale Darstellung eines Trägermaterials
- Fig. 3. Lichtmikroskopische Aufnahme eines horizontalen Querschnitts durch ein Trägermaterial
- Fig. 4. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Trägermaterials von der Seite
- Fig. 5. Dreidimensionale Darstellung eines Trägermaterials mit beidseitig beflocktem Basismaterial
- Fig. 6. Schnittdarstellung eines zweilagigen Trägermaterials
- Fig. 7. Dreidimensionale Darstellung eines dreilagigen Trägermaterials
- Fig. 8. Draufsicht auf ein partiell nicht beflocktes Trägermaterial
- Fig. 9. Schnittebene durch ein mehrlagiges Trägermaterial mit gefäßartigen Hohlräumen

In den beigefügten Zeichnungen werden folgende Bezugszeichen verwendet:

- 1 Basismaterial
- 2 Klebstoff
- 3 Fasern
- 4 Bereiche ohne Fasern auf dem Basismaterial bzw. im Trägermaterial
- 5 Hohlräume

Fig. 1 zeigt eine Schnittdarstellung eines Trägermaterials. Dieses Trägermaterial besteht aus einem flachen Basismaterial (1), welches einseitig mit einer Klebstoffschicht (2) beschichtet und mit 1 mm langen Fasern (3) elektrostatisch beflockt ist.

Das biokompatible, resorbierbare Basismaterial (1) besteht aus einem mineralisierten Hydroxylapatit-Kollagen-Tape mit einem Durchmesser von 7 cm und einer mittleren Dicke von 0,2 mm. Das Hydroxylapatit-Kollagen-Tape wird aus mineralisiertem Kollagen (EP 0945146, EP 0945147, US 6384196, US 6384197. J.-H. Bradt, M. Mertig, A. Teresiak, W. Pompe: Biomimetic mineralization of collagen by combined fibril assembly and calcium phosphate formation. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 2694-2701) hergestellt, wie in (R. Burth, M. Gelinsky, W. Pompe: Collagen-hydroxyapatite tapes – a new implant material. *Tech. Textile* **1999**, *8*, 20-21) beschrieben.

Der Klebstoff (2) besteht aus Pharma-Gelatine, DGF Stoess AG, Eberbach, Deutschland, einem biokompatiblen, resorbierbaren Material.

Die Fasern (3) haben eine Länge von 1 mm und einen Durchmesser von 0.03 μm . Das Fasermaterial besteht aus PHB (Poly- β -hydroxybutyrat), einem biokompatiblen und resorbierbaren Material mit einem E-Modul von 7 GPa. Diese Kurzfasern erfüllen die Anforderungen der Flocktechnologie an den elektrischen Oberflächenwiderstand von 10^6 - $10^8 \Omega$ hinreichend.

Zur Herstellung des Trägermaterials wird wie folgt verfahren:

Die Pharma-Gelatine (2) wird im Verhältnis 5 g : 100 ml mit destilliertem Wasser angesetzt, mittels Magnetrührer MR 3001 K und Temperaturregler EKT 3001, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland, unter Rühren auf 60°C erwärmt und nach vollständigem Auflösen der Gelatine auf 25°C abgekühlt.

Für die elektrostatische Beflockung wird eine Labor-Flockanlage der Fa. Maag Flockmaschinen GmbH, Iserlohn, Deutschland, verwendet. Die Anlagentechnik wurde für die Verarbeitung von 1 mm langen Kurzfasern (3), durch die Auswahl einer geeigneten Siebelektrode mit 1,2 mm Lochdurchmesser und der Einstellung des Beflockungsabstandes auf 125 mm angepasst.

Die Pharma-Gelatine (2) wird gleichmäßig auf das Basismaterial (1) mittels Siebdruckschablone mit einer Klebstoffdicke (2) von 0,4 mm aufgebracht. Anschließend wird das mit Pharma-Gelatine (2) beschichtete Basismaterial (1) der Beflockungsanlage zugeführt. Die Flockspannung wird innerhalb von 20 Sekunden stufenlos von 20 kV auf 60 kV gesteigert, um hohe Flockdichten zu erreichen.

Das Hochspannungsfeld wird noch weitere 10 Sekunden aufrechterhalten, um überschüssige Kurzfasern (3) durch die Feldwirkung von dem Trägermaterial zu lösen.

Anschließend werden die mit biokompatiblen und resorbierbaren Kurzfasern (3) so beflockten Hydroxylapatit-Kollagen Tapes gefriergetrocknet. Damit beim Trocknungsprozess auftretende Eigenspannungen nicht zum Verwerfen der Tapes führen, werden diese während dem Trocknen mit porösen Druckplatten beschwert. Durch das Gefriertrocknen schrumpft die Klebstoffdicke auf 0,02 mm.

Nach dem Gefriertrocknen wird die Klebschicht (2) der nun beflockten Hydroxylapatit-Kollagen-Tapes durch Einlegen für 12 Stunden in eine 1%-igen Lösung von EDC N³-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid Hydrochlorid), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, in 80%-igem Ethanol chemisch quervernetzt. Bei der Quervernetzung werden kovalente Bindungen zwischen den Kollagenmolekülen der Gelatine-Klebschicht (2) und in geringerem Ausmaß auch zwischen den Kollagenmolekülen der Klebeschicht und dem Basismaterial (1) eingeführt, welche das Trägermaterial zusätzlich stabilisieren.

Das so hergestellte Trägermaterial zeichnet sich durch eine Flockfaserdichte von 290 Fasern/mm², einer Druckstabilität von $\sigma_D = 0.13$ MPa (linear elastisches Verhalten), einem Druckmodul von $E = 0.25$ MPa, einer Faserauszugsfestigkeit von $\sigma_F = 0.41$ MPa und Faserabstände zwischen 35 μ m und 70 μ m aus.

Vorteilhaft verhindert die hohe Faserauszugsfestigkeit ein Loslösen einzelner Fasern (3) vom Basismaterial (1) unter Zugbelastung.

Besonders vorteilhaft ist die hohe Druckstabilität und die Elastizität des Trägermaterials. Diese Werte erfüllen die mechanischen Anforderungen, die an Stützstrukturen in natürlichen Geweben und Organen, einschließlich Knorpel, gestellt werden.

Zur Besiedelung mit Zellen wird aus dem so hergestellten beflockten Hydroxylapatit-Kollagen-Tape eine Probe mit einem Durchmesser von 13 mm ausgestanzt. Die Probe wird durch Bestrahlung mit Gamma-Strahlung sterilisiert und anschließend für 24 Stunden in 5 ml sterilem Zellkulturmedium (Eagle's Medium, modifiziert nach Dulbecco, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) eingelegt. Das Medium wird alle 6 Stunden ausgetauscht.



Anschließend wird die Probe aus dem Medium herausgenommen und durch Auflegen auf ein steriles, saugfähiges Tuch etwas abgetrocknet. Die Probe wird nun mit der beflockten Seite nach oben in eine übliche 24er-Well-Zellkulturplatte überführt und eine Suspension von 4×10^4 primären, humanen Chondrozyten in 1 ml Zellkulturmedium wird mittels einer Pipette aufgebracht. Das Well wird mit weiteren 1,5 ml Zellkulturmedium aufgefüllt, um die Probe komplett mit Medium zu bedecken. Die Zellkulturplatte wird nun für 24 h in einem üblichen Zellkultur-Brutschrank bei Standardbedingungen inkubiert. Während dieser Zeit erfolgt die Adhäsion der Chondrozyten an das Trägermaterial. Anschließend wird das so besiedelte Tape in frisches Medium überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 2-täglichen Mediumwechsel unter Standardbedingungen weiter kultiviert.



Fig. 2 zeigt eine dreidimensionale Darstellung eines Trägermaterials, welches identisch wie das aus Fig. 1 aufgebaut ist. Die Klebstoffschicht (2) wurde aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt.

Fig. 3 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines horizontalen Querschnitts durch ein Trägermaterial, welches, wie zu Fig. 1 beschrieben, hergestellt wurde.

Für die mikroskopische Aufnahme wurde das Trägermaterial in Epoxidharz (SpeciFix-20, Fa. Struers) parallel zur Oberfläche eingebettet und in einem Schleif- und Poliervorgang für die optische Auswertung der Faserabstände vorbereitet. Die lichtmikroskopische Aufnahme wurde am Auf- und Durchlichtmikroskop AxioTech 100, Fa. Zeiss (50x) durchgeführt.

Aus dieser Aufnahme ist die Anordnung der Fasern (3) auf der Oberfläche des Basismaterials (1) ersichtlich. Fig. 3 zeigt, dass sich durch die Verteilung der Fasern (3) eine regelmäßige Verteilung von Zwischenräumen zwischen den Fasern (3) ergibt, die mit einem mittleren Durchmesser von 40 μm bis 130 μm die optimale Größe für die Besiedlung mit Zellen haben.

Fig. 4 zeigt eine Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Trägermaterials.

Dazu wurde eine Probe aus einem, wie zu Fig. 1 beschrieben hergestellten, Trägermaterial mit einer Schere ausgeschnitten, auf einer Aluminium-Halterung befestigt und im Vakuum mit Kohlenstoff bedampft. Die Aufnahme wurde bei einem Arbeitsabstand von 13 mm und einer Beschleunigungsspannung von 5 kV an einem Zeiss DSM 982 Gemini (Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) Rasterelektronenmikroskop gemacht.

Aus dieser Aufnahme ist die vertikale Anordnung der Fasern (3) auf dem Basismaterial (1) ersichtlich. Fig. 4 zeigt, dass sich durch die elektrostatische Beflockung nahezu alle Fasern (3) in einer geordneten, nahezu senkrechten Ausrichtung zu der Oberfläche des Basismaterials (1) angeordnet sind. Nur die Fasern (3) am vorderen Rand sind bedingt durch das Ausschneiden der Probe durch die Schere etwas zur Seite geknickt.

Fig. 5 zeigt eine dreidimensionale Darstellung eines Trägermaterials, in dem das Basismaterial (1) beidseitig mit Fasern (3) beflockt ist.

Dieses Trägermaterial ist aus den gleichen Materialien aufgebaut, wie die zu Fig. 1 beschriebenen. Es enthält ebenfalls eine Klebstoffschicht zwischen den Fasern (3) und dem Basismaterial (1), die aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt ist.

Zur Herstellung dieses Trägermaterials mit beidseitig beflocktem Basismaterial (1) wird ein Kollagen-Tape (1), wie zu Fig. 1. beschrieben, zuerst auf einer Seite mit Fasern (3) elektrostatisch beflockt. Das so gebildete Trägermaterial wird anschließend umgedreht und auf der zweiten Seite, wie zu Fig. 1. beschrieben, ebenfalls mit Fasern (3) beflockt.

Das beidseitig beflockte Tape (1) wird anschließend, wie zu Fig. 1 beschrieben, gefriergetrocknet und quervernetzt.

Fig. 6 zeigt eine Schnittdarstellung eines zweilagigen Trägermaterials.

Dieses mehrlagige Trägermaterial besteht aus zwei Trägermaterialien, in welchen die Basismaterialien (1) einseitig mit Fasern (3) beflockt sind und welche analog zu den in Fig. 1 beschriebenen aufgebaut sind. Des weiteren enthält das zweilagige Trägermaterial eine Klebstoffschicht (2) zwischen den beiden Trägermaterialien.

Das Fasermaterial besteht hier aus Polylactid (PLA), einem biokompatiblen und resorbierbaren Material, mit einem E-Modul von 5 bis 7 GPa. Die Fasern (3) haben eine Länge von 1 mm und einen Durchmesser von 30 μm .

Zur Herstellung des zweilagigen Trägermaterials wird wie folgt verfahren:

Es werden 2 Trägermaterialien, analog zu Fig. 1 beschrieben, hergestellt. Als Fasern (3) werden jedoch oben genannte Fasern (3) aus Polylactid (PLA) verwendet.

Auf die nicht-beflockte Seite des ersten Trägermaterials wird eine Gelatinelösung, die wie zu Fig. 1 beschrieben hergestellt ist, mit einer Klebstoffdicke (2) von 0,02 mm aufgebracht. Die mit Klebstoff (2) beschichtete Seite des ersten Trägermaterials wird nun auf die beflockte Seite des zweiten Trägermaterials aufgesetzt. Das so hergestellte

zweilagige Trägermaterial wird, wie zu Fig. 1 beschrieben, gefriergetrocknet und quervernetzt.

Fig. 7 zeigt eine dreidimensionale Darstellung eines dreilagigen Trägermaterials.

Dieses dreilagige Trägermaterial ist aus zwei Trägermaterialien mit einseitig beflockten Basismaterialien (1) und einem Trägermaterial mit beidseitig beflocktem Basismaterial (1) zusammengesetzt.

Die Trägermaterialien mit einseitig beflockten Basismaterialien (1) sind wie zu Fig. 1 beschrieben aufgebaut und hergestellt.

Das Trägermaterial mit beidseitig beflocktem Basismaterial (1) ist wie zu Fig. 6 beschrieben aufgebaut und hergestellt.

Zur Herstellung dieses mehrlagigen Trägermaterials werden die einzelnen Trägermaterialien mit einseitig beflockten Basismaterialien (1) jeweils mit ihrer Faserschicht (3) in eine Faserschicht (3) des Trägermaterials mit beidseitig beflocktem Basismaterial (1) gesteckt. Durch dieses Ineinanderstecken der Faserschichten (3) halten die Trägermaterialien analog des Klettverschlussprinzips zusammen, ohne dass es einer zusätzlichen Klebstoffschicht (2) bedarf.

Fig. 8 zeigt eine Draufsicht auf ein partiell nicht beflocktes Trägermaterial.

Das in Figur 8 dargestellte Trägermaterial ist in gezielt ausgewählten Bereichen 4 nicht mit Fasern beflockt. Bezüglich der Materialien ist es , wie zu Fig. 1, aufgebaut und wie zu Fig. 1 beschrieben beflockt. Die nicht beflockten Bereiche 4 werden dadurch gebildet, dass mittels in der Flocktechnik üblichen Siebdruckschablonen entsprechend dem Muster der Siebdruckschablonen, ein wie zu Fig.1 beschriebener, Klebstoff 2 aufgetragen wird. Die durch das Muster partiell mit Klebstoff 2 beschichteten Basismaterialien 1 werden, wie zu Fig.1 beschrieben beflockt, wobei bei klebstofffreien Flächen keine Fasern 3 gebunden werden.

Fig. 9 zeigt eine Schnittebene durch ein dreilagiges Trägermaterial mit Hohlräumen **5**. Dieses ist aus drei Trägermaterialien mit einseitig beflockten Basismaterialien **1** aufgebaut. Diese Trägermaterialien enthalten definierte, aber unterschiedliche, Löcher (Durchbrüche).

Das nachträgliche Ausschneiden hat den Vorteil, dass die Flockfasern am Lochrand nahezu senkrecht angeordnet sind.

Zur Herstellung dieses mehrlagigen Trägermaterials mit Hohlräumen **5** werden in drei Trägermaterialien, die wie zu Fig.1 beschrieben aufgebaut und hergestellt sind, nach der Beflockung Löcher ausgestanzt. Die so perforierten Trägermaterialien werden übereinander gestapelt, wobei die Löcher z. T. übereinander angeordnet werden. Durch diese Anordnung werden in dem dreidimensionalen Mehrschichtträgermaterial röhrenförmige Hohlräume gebildet. Bei einer späteren Besiedlung mit Zellen dienen diese Hohlräume unter anderem der Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr zu den Zellen.

Patentansprüche

- 1) Biokompatibles Trägermaterial für die Gewebe- und Zellkultur und die Herstellung von Implantatmaterialien, bestehend aus einem Basismaterial (1), das auf mindestens einer Seite mit Fasern (3) elektrostatisch beflocht ist.
- 2) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Basismaterial (1) auf mindestens einer Seite mit Klebstoff (2) beschichtet ist.
- 3) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Basismaterial (1), der Klebstoff (2) und/oder die Fasern (3) aus resorbierbarem Material bestehen.
- 4) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Klebstoff (2) quervernetzt ist.
- 5) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das resorbierbare Material aus einem resorbierbaren Polyester, wie zum Beispiel Polylactid (PLA), Caprolacton, Polyhydroxybutyrat (PHB), Polyglycolsäure, deren Derivate oder Copolymere, besteht.
- 6) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das resorbierbare Material aus Kollagen, Kollagenderivaten, Hyaluronsäure, oder Gelatine besteht.
- 7) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Länge der Fasern (3) zwischen 0,3 mm und 3 mm beträgt.
- 8) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Länge der Fasern (3) zwischen 0,5 mm und 1,5 mm beträgt.

- 9) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Durchmesser der einzelnen Fasern (3) zwischen 10 μm und 200 μm beträgt.
- 10) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Fasern (3) Hohlfasern sind.
- 11) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Basismaterial (1) eine flache, wellige oder gewölbte Form, insbesondere die Form einer Membran oder eines Tapes hat.
- 12) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Basismaterial (1) ein dreidimensionaler Formkörper oder Hohlkörper ist.
- 13) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Basismaterial (1) aus einem nicht-resorbierbaren biokompatiblen Material, wie z. B. einem biokompatiblen Metall oder Kunststoff, Keramik, Glas oder Kohlenstoff aufgebaut ist.
- 14) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Fasern (3) auf dem Basismaterial (1) in einem mittleren Abstand von 40 μm bis 130 μm angeordnet sind.
- 15) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass an das Basismaterial (1), den Klebstoff (2) oder die Fasern (3) Wirkstoffe, wie zum Beispiel pharmazeutische Stoffe, Peptide, Proteine, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Chemokine, Oligonukleotide, Nukleinsäuren, wie cDNA, oder Nukleinsäurederivate, gebunden sind.

- 16) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens teilweise mineralisiert ist.
- 17) Biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass nach oder bei der Kultivierung mit Zellen das Basismaterial (1) und/oder der Klebstoff (2) entfernt wird.
- 18) Mehrlagiges biokompatibles Trägermaterial, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens zwei biokompatible Trägermaterialien nach einem der Ansprüche 1 bis 14 miteinander verbunden sind.
- 19) Mehrlagiges biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die biokompatiblen Trägermaterialien nach einem der Ansprüche 1 bis 17 übereinander gestapelt sind.
- 20) Mehrlagiges biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die biokompatiblen Trägermaterialien nach einem der Ansprüche 1 bis 17 mit ihren Faserschichten (2) ineinander gesteckt sind.
- 21) Mehrlagiges biokompatibles Trägermaterial nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass es Hohlräume (5) enthält, die untereinander verbunden oder voneinander isoliert sind.

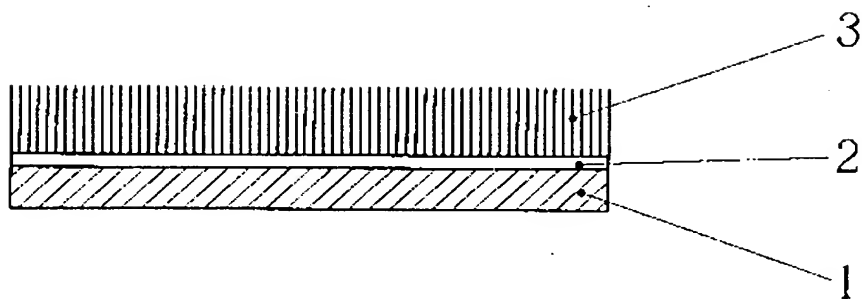


Fig. 1.

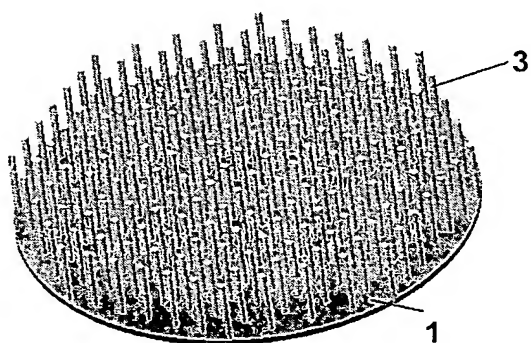


Fig. 2.

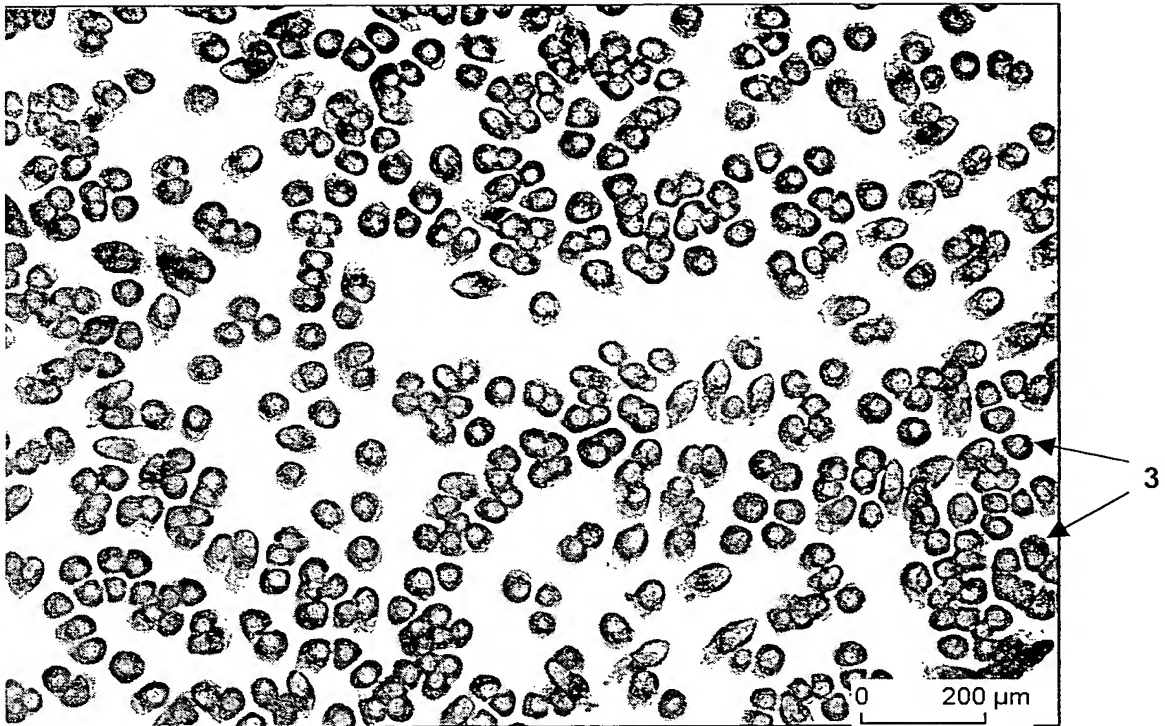


Fig. 3.



Fig. 4.

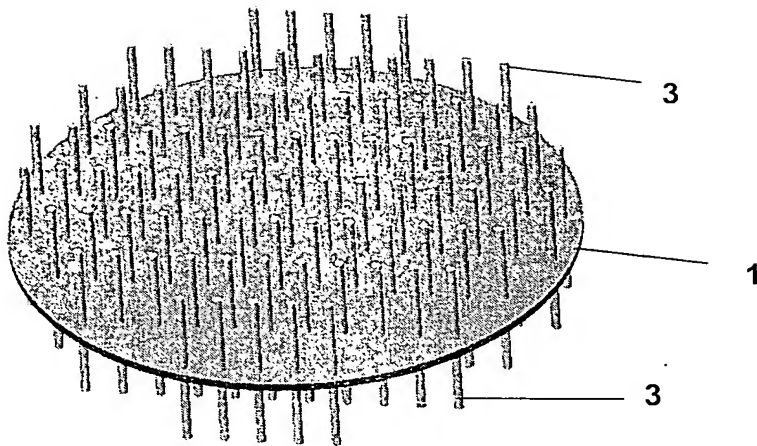


Fig. 5.

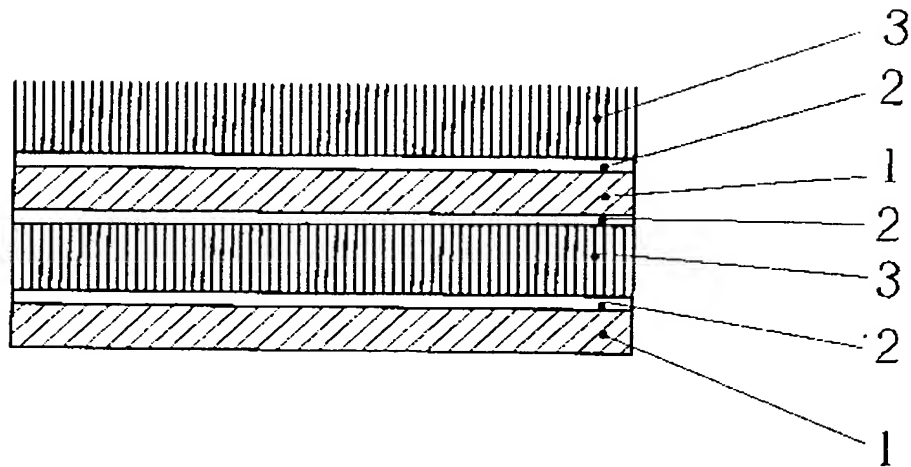


Fig. 6.

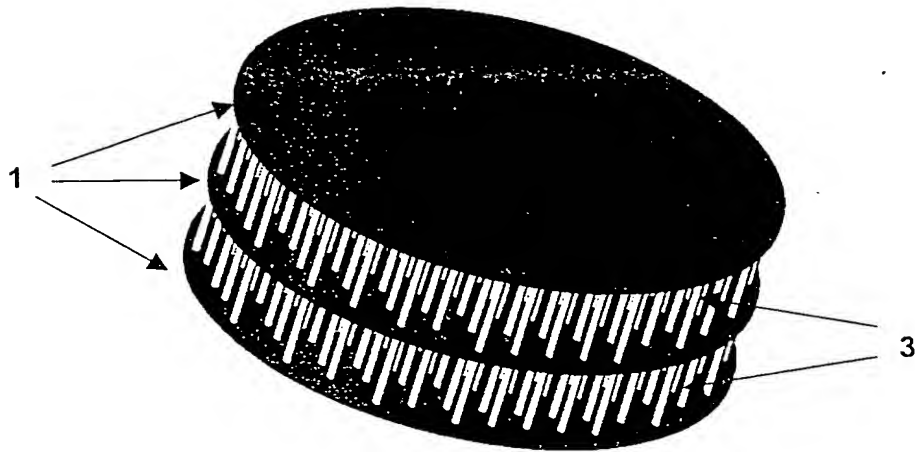


Fig. 7.

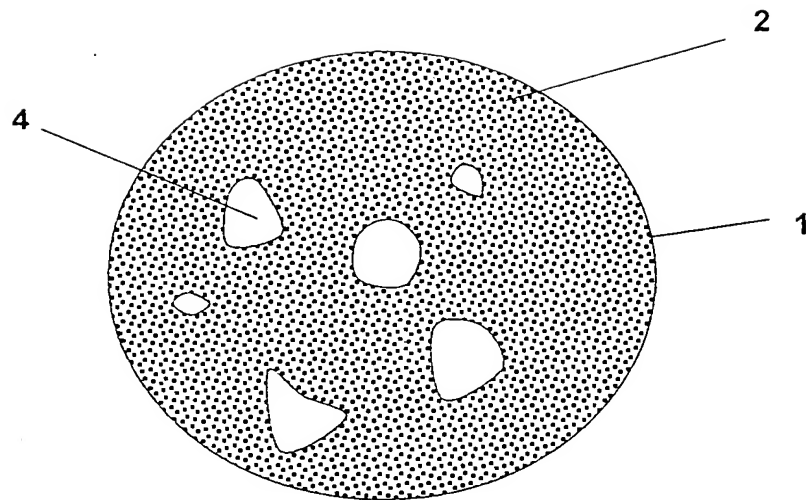


Fig. 8.

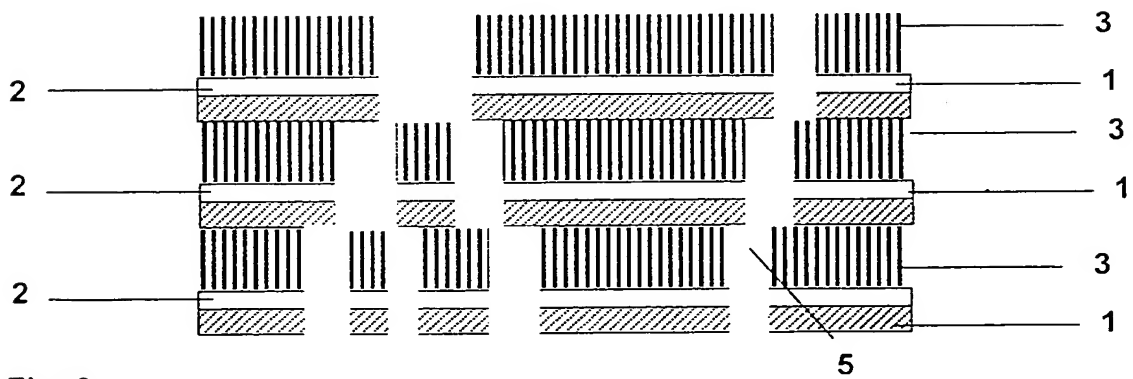


Fig. 9.